

バイオ医薬品の製造技術研究開発： 国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術プロジェクト（後編）

バイオ医薬品ダウンストリーム クロマトグラフィープロセスの効率化

吉本 則子・山本 修一*

はじめに

抗体医薬 (monoclonal antibody, mAb) に代表されるバイオ医薬品の製造は複雑で低効率なプロセスである。長期にわたる細胞培養後、生産された目的物質を培養液から複数のクロマトグラフィー (liquid chromatography, LC) を逐次実施して高純度に精製する。

典型的な mAb の精製 (ダウンストリーム) プロセス (downstream process, DSP) を図1に示す¹⁾。最初に mAb に強い生物学的親和性を有するプロテイン A クロマトグラフィー (PAC) により、大量に吸着・溶出操作を行う。この操作を、キャプチャステップという。その後、低 pH (pH 4 以下) で一定時間保持する低 pH ウイルス不活化を実施する。さらに、2種類のクロマトグラフィーにより不純物を非常に低レベルにまで除去する。この工程は、抗体純度 90% 以上から少量の不純物を除去するのでポリッシングと呼ばれる。最後にウイルスろ過を行う。

多くのユーザー (バイオ製薬企業) では、このような DSP を標準化して (プラットフォームとして) 構築し、各 LC 条件 (カラムサイズ、流速などの操作条件、移動相条件など) を (多くの場合、試行錯誤法により) 最適

化している。

製造プロセスの全コストの 50–60% 以上を DSP が占めると指摘されており²⁾、DSP の効率化は重要である。

高効率 mAb 製造プロセスの構築のため、2013 年に次世代バイオ医薬品製造技術研究組合 (<http://cho-mab.or.jp/>) が設立され、Cell-line engineering, Upstream process, DSP, 高度分析技術などの研究開発を 2017 年まで 5 年間にわたって行った。本稿では、DSP に関する研究成果について紹介する。

高度ダウンストリームプロセス (DSP) の開発

DSP の主体であるクロマトグラフィーは、基本的に回分操作である。図2に示すような装置で、複数のタンクを切り替えてサンプル、洗浄、溶出、再生、平衡化を実施する (図3)。装置 (配管やバルブなどのアクセサリ) やカラムの適正な洗浄と、洗浄後の装置およびカラムのバリデーションは重要であり、また、装置とカラムの洗浄・バリデーションのコストは高い。

シングルユースシステムは、洗浄とバリデーションが不要になるという大きなメリットがある。完全なシングルユースシステムはタンク、配管、バルブ、ポンプヘッド、センサーがディスプレイであるが、実際には、後述するハイブリッド型 (一部は洗浄・再利用) が多く

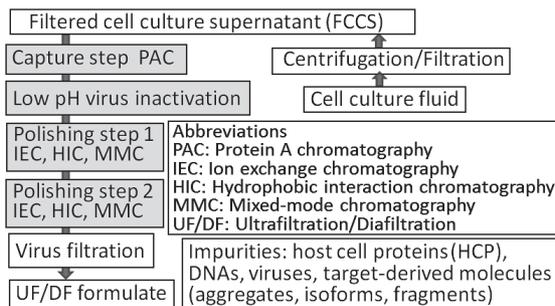


図1. 典型的な抗体精製プロセス (DSP)

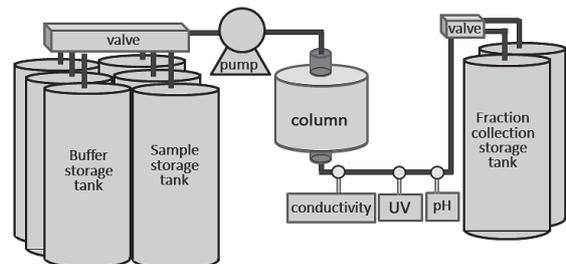


図2. 製造用クロマトグラフィープラント

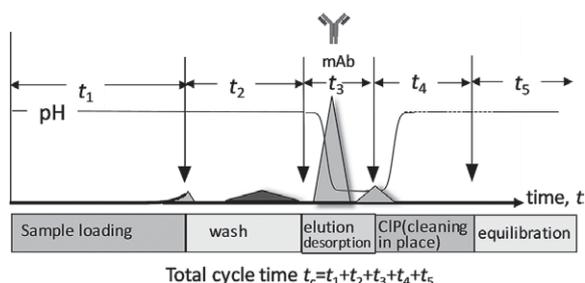


図3. 典型的なクロマトグラフィー操作：プロテインAクロマトグラフィーによるキャプチャークロマトグラフィー操作

使用されている。

図3は、プロテインAアフィニティクロマトグラフィー (PAC) によるキャプチャーステップの操作を示している。抗体を含む培養液をカラムに連続的に供給し、抗体がカラムから漏出する前に、試料供給を停止し、不純物を洗浄した後に、酸性溶液により抗体を溶出脱着して回収する。その後、再生・再平衡化して、再度利用する。試料供給量が20カラム体積、それ以外の洗浄、溶出、CIP (cleaning-in-place)、平衡化が40カラム体積程度になることが多く、図2に示すように大型の溶液タンクが複数本、必要となる。

PACは非常に高価な分離剤なので、カラムの再利用は必須である。また、ユーザーがPAC分離剤をクロマトグラフィーカラムに適正に充填しなければならない。50-100 L以上の大型カラムを全自動充填できる機能を装備したカラムハウジングも開発されているが、充填条件はユーザーが設定し、充填後にカラム性能の確認が必要である。分離終了後に再生・平衡化されたカラムも同様にカラム性能の確認が要求される。

これら充填操作と再利用におけるバリデーションを不要にする方法として、プレパックカラムが期待されている。

分析用HPLCカラムを自分で充填するユーザーはいないが、タンパク質精製プロセス開発用の小型カラムを自分で充填する研究者は多い。充填するにはノウハウが必要となるので、素人が適正なカラムを作製することは難しい。また、そのための訓練と時間も必要となる。さまざまな分離剤とカラムサイズに対応したプレパックカラムが市販されていなかったことも理由である。

大型カラムの場合は、数回の利用後、保存し再利用されるが、最適化されたプレパックカラムの場合は、1バッチの処理に使用後、廃棄することが想定され、保存後、再利用時のバリデーションが不要となる。

表1. 開発したプレパックカラム

	用途	ベッド体積	内径 (mm)	ベッド高 (cm)
A	スクリーニング	1 mL	7	2.5
B1	プロセス開発	5 mL	8	10
B2	プロセス開発	10 mL	8	20
C1	プロセス開発	20 mL	15	10
C2	プロセス開発	40 mL	15	20
D	パイロット	1 L	80	20
E	小型製造	~10 L	230	20

高性能分離剤プレパックカラムの開発

プレパックカラムに要求されるのは、通常のHPLCカラム同様に、供給されたカラムが常に同じ分離性能であり、繰り返し利用による劣化挙動も同じであることである。

本プロジェクトでは、先行海外製品を凌駕する動的吸着量のプロテインAアフィニティクロマトグラフィー分離剤をはじめとして、優れた分離性能のイオン交換クロマトグラフィーや複数の相互作用を利用するミクスドモードクロマトグラフィー分離剤の開発に成功した。さらに、抗体Fc領域に親和性を持つリガンド (東ソー) や、抗体Fab領域への高特異性と高回収率が可能なプロテインGリガンド (カネカ)、κ軽鎖を含有する広範囲な抗体種に対して高い結合能を有するプロテインLリガンド (カネカ) による新規アフィニティクロマトグラフィー分離剤も開発した。

次に、下記のサイズのプラスチックカラムハウジングを開発し、さまざまな分離剤を最適に充填するプロトコルを確立した。開発したプレパックカラムの規格を表1にまとめる。A-Cのプロトタイプの構造の最適化には3Dプリンターを活用した。

A, B, Dの充填済みプレパックカラムの外観の写真を図4に示す。また、カラムDの充填性能評価結果も図中に示した。アセトンのパルス応答の曲線は、対称性も高く、先行海外品に比べ高い理論段数が得られている。

プレパックカラムを利用したプロセス開発とGMP施設における実証プロセスの実施

次に、プレパックカラム利用して5つの高効率抗体精製プロセスを開発し、標準作業手順書 (SOP) を作成した。このSOPに基づき、神戸GMP施設にて50 L培養液からプレパックカラムとシングルユースシステムで既

存プロセスの1/2以下の時間で実施できることを実証した。どのプロセスにおいても最終精製品の残留DNA、HCP（宿主セルプロテイン）、残留脱離プロテインA

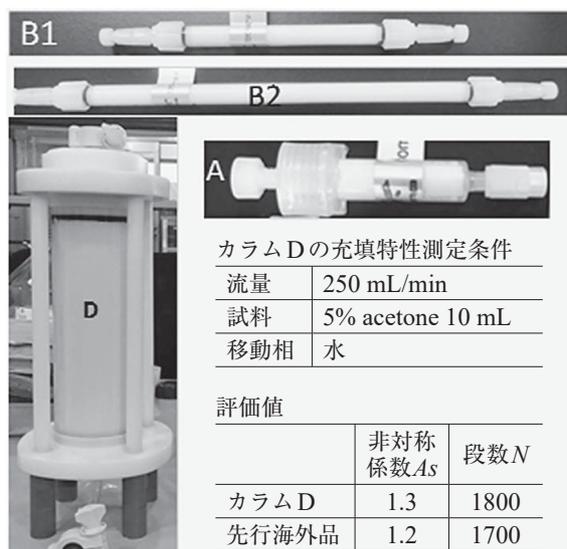


図4. 充填済みプレパックカラム（A, B, D）の外観と、Dカラムの充填性能評価値。B1はベッド高10 cm, B2はベッド高20 cm. 非対称係数と理論段数は通常の方法で計算されている³⁾. 理論段数=応答曲線保持時間/応答曲線の分散.

量は、設定規格値以下となり、ステップ回収率は90%以上であった。

5種類のプロセスの詳細を表2にまとめる。DSP-5を除き、基本的にはPACに続いて2種類のポリッシュクロマトグラフィーで実施している。

プロセス開発の具体的な手順は以下のとおりである。[1]-[3]は製薬メーカーの専門家を含む検討会議で決定した。[1]-[5]は最短3-4か月で完了することができ、迅速なプロセス開発が可能であった。

- [1] 1 mLカラム（A）を用いたプロセス構成と条件検討
- [2] 10-20 mLカラム（B, C）を用いた最適化（試料負荷量, 滞留時間, pH, 塩濃度など）
- [3] 1 Lカラム（D）プロセス運転条件決定とSOP作成
- [4] 1 Lプレパックカラム（D）準備
- [5] GMP施設で精製実施
- [6] 精製結果分析 残留DNA, 残留HCP, 残留脱離Protein Aの3項目で評価

本プロジェクトで開発されたシングルユースクロマトグラフィー精製システムは、ハイブリッド型と呼ばれる装置であり、タンパク質と接する部分はプラスチックによりシングルユース化されており、緩衝液のみと接する

表2. 開発した5種類のプラットフォーム精製プロセス

名称	使用分離剤（カラム）	メーカー	リガンド	分離剤基材
DSP-1	AF-rProtein A HC-650F	東ソー	a	合成ポリマー
	GigaCap S-650M	東ソー	b	合成ポリマー
	GigaCap Q-650M	東ソー	c	合成ポリマー
DSP-2	KANEKA KanCapA 3G	カネカ	a	セルロース
	Cellufine MAX IB	JNC	d	セルロース
	Cellufine MAX S-h	JNC	b	セルロース
DSP-3	Amsphere A3	JSR	a	合成ポリマー
	BioProS75	ワイエムシイ	b	合成ポリマー
	BioProQ75	ワイエムシイ	c	合成ポリマー
DSP-4	Protein A MabSpeed rP202	三菱ケミカル	a	合成ポリマー
	ChromSpeed Q103	三菱ケミカル	c	合成ポリマー
	ChromSpeed S103	三菱ケミカル	b	合成ポリマー
DSP-5	Protein A ADREPMA 改良品	大阪ソーダ	a	球状シリカ
	QyuSpeed D	旭化成メディカル	c	中空糸膜型

- a) プロテインAクロマトグラフィー
- b) 陽イオン交換クロマトグラフィー
- c) 陰イオン交換クロマトグラフィー
- d) ミクストモードクロマトグラフィー

注1：DSP-1からDSP-4はポリッシュに2つのクロマトグラフィーを使用しているが、DSP-5はポリッシュをメンブレン（中空糸）アドソーパー（膜型吸着体）1種類で実施した。

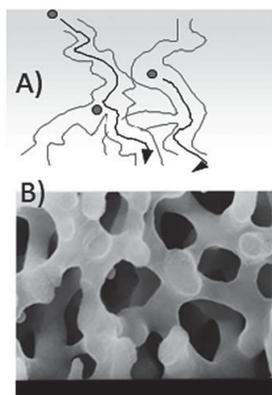


図5. A) モノリシックロマトグラフィーの概念図とB) シリカモノリスの電子顕微鏡写真 (<http://www.k-monotech.co.jp/>)

部分はステンレス製でCIP可能な構造となっている。完全シングルユース化された装置より簡単な構造であり、操作ミスの軽減とコストダウンが可能になる。

プロセスアナリティカルテクノロジー (PAT) の開発

一般的なクロマトグラフィー装置は図2のように、紫外吸収、電導度、pHの検出が標準である。これらの検出器では、不純物を含む培養液中の抗体濃度を選択的に検出することができない。

カラムからの溶出液を間歇的にサンプリングして、HPLC分析をすれば、抗体を選択的に検出できるが、クロマトグラフィープロセスのオンラインモニタリングとして活用するには、1分以内の超高速分離が必要である。数マイクロメートルの貫通孔が主体の一体型材料であるモノリス (図5) を基材としたクロマトグラフィーでは、細孔拡散抵抗がほとんどなく物質移動が迅速なので、滞留時間が数秒でも良好な分離が可能となる。プロテインAを固定化した0.2 mLのシリカモノリス (京都モノテック) により滞留時間2秒、分析時間1分以内で完了するシステムによりオンラインモニタリングシステムを構築し、実証することに成功した。

まとめと今後の展望

DSPの効率化のために、シングルユースシステムを開発した。高性能分離剤と、それを適切に充填したプレパックカラムを開発した。海外先行品を上回る高性能クロマトグラフィー分離剤を開発し、これらを充填したプロセス設計用 (1–40 mL) および小型製造用 1 L プレパックカラムを製造した。高効率精製プロセスを5種類開発

し、神戸GMP施設において50 L培養液からシングルユースシステムで既存プロセスの1/2以下の時間で実施できることを実証した。高速PAT装置も開発し、実用性を確認した。

さらなるDSPの効率化として連続化 (連続操作) が期待されている。クロマトグラフィーの連続化は複数カラムの切り替え操作が一般的であり、小型で同じ性能のカラムが必要となる。プレパックカラムが最適であり、本プロジェクトで開発されたプレパックカラムは、連続クロマトグラフィーにおいても活躍できると考えている。また、シングルユースクロマトグラフィー精製システムは連続操作においても有効である。

回分操作および連続操作のどちらにおいても数学モデルによるプロセス迅速開発とプロセス最適化は重要である³⁻⁶⁾。特に連続操作ではシミュレーションモデルがないと操作条件を決定することができないので、シミュレーションモデルとともにシミュレーションモデルに必要なパラメーターの迅速決定方法の研究開発が必要である。

また、連続操作においてはPATが必須であり、超高速モノリスPAC以外にも、不純物の迅速検出などのオンラインモニタリングシステムのさらなる開発が望まれる。

謝 辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号 (JP17ae0101003) の支援によって行われた。

文 献

- 1) Levine, H. L. *et al.*: *BioProcess International*, **11**, 40-5 (2013).
- 2) Farid, S. S.: *BioPharm International Supplement*, **21**, 37 (2008).
- 3) Carta, G. and Jungbauer, A.: *Protein Chromatography*, Wiley-VCH (2010).
- 4) Yoshimoto, N. and Yamamoto, S.: *Preparative chromatography for separation of proteins* (Staby, A. *et al.*: Eds.), p. 111, Wiley (2017).
- 5) 吉本則子, 山本修一: *PHARM TECH JAPAN*, **34**, 80 (2018).
- 6) 吉本則子, 山本修一: *分離技術*, **49**, 29 (2019).